

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/DE04/002761

International filing date: 13 December 2004 (13.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE
Number: 10 2004 043 449.2
Filing date: 06 September 2004 (06.09.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 16 March 2005 (16.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung****Aktenzeichen:**

10 2004 043 449.2

Anmeldetag:

06. September 2004

Anmelder/Inhaber:

co.don AG, 14513 Teltow/DE

Bezeichnung:Verfahren zur Herstellung von Bandscheibenzell-
transplantaten und deren Anwendung als
Transplantationsmaterial**IPC:**

C 12 N, A 61 F, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 1. Februar 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Stenschus

ANWALTSKANZLEI
Gulde Hengelhaupt Ziebig & Schneider
Patente Marken Design Lizenzen

Gulde Hengelhaupt Ziebig & Schneider Schützenstraße 15-17, 10117 Berlin

Patentanwälte
European Patent & Trademark Attorneys*

Klaus W. Gulde, Dipl.-Chem.*
Jürgen D. Hengelhaupt, Dipl.-Ing.³
Dr. Marlene-K. Ziebig, Dipl.-Chem.²
Henry Schneider, Dipl.-Ing.*
Wolf-Jürgen Walter, Dipl.-Chem., Dipl.-Jur.*
Wilfried H. Goesch, Dipl.-Ing.¹
Dieter K. Wicht, Dipl.-Ing.
Isolde U. Winkler, Dipl.-Ing.*
Dorit Rasch, Dipl.-Chem.*
Dr. Sven Lange, Dipl.-Biologe²
Stephan Mainitz, Dipl.-Chem.
Dr. Diane Reinstädler, Dipl.-Chem.
Tobias Sommer, Dipl.-Math.

Rechtsanwälte
Jörg K. Grzam
Marco Scheffler

Schützenstraße 15-17
D-10117 Berlin-Mitte

Tel.: 030/20623-0
Fax: 030/20623-127

office@berlin-patent.net
www.berlin-patent.net

Datum/date
Berlin, 06. September 2004

Unser Zeichen/our reference
P248203DE1-La

co.don Aktiengesellschaft
Warthestraße 21
14513 Teltow

Verfahren zur Herstellung von Bandscheibenzelltransplantaten
und deren Anwendung als Transplantationsmaterial

¹ Büro Berlin-Adlershof
Rudower Chaussee 29
D-12489 Berlin
Tel.: 030/63923195
Fax: 030/63923199

² Büro Berlin-Buch
Robert-Rössle-Straße 10
D-13125 Berlin
Tel.: 030/94892170
Fax: 030/94892172

³ Büro München
Sendlinger Straße 2
D-80331 München
Tel.: 089/23236182
Fax: 089/23236183

5

10

Verfahren zur Herstellung von
Bandscheibenzelltransplantaten und deren Anwendung als
Transplantationsmaterial

Beschreibung

15

20

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur in vitro Herstellung von Bandscheibenknorpelzelltransplantaten aus erkranktem Bandscheibengewebe von Patienten und dessen Anwendung als Transplantationsmaterial zur Behandlung von erkrankten Bandscheiben. Die Erfindung betrifft weiterhin dreidimensionales, vitales und mechanisch stabiles Bandscheibenknorpelgewebe und dessen Verwendung als Transplantationsmaterial zur Behandlung von erkrankten Bandscheiben sowie zur Testung von Wirkstoffen. Gegenstand der Erfindung sind weiterhin die hergestellten Bandscheibenzelltransplantate und die hergestellten Bandscheibenknorpelgewebe und therapeutische Zubereitungen, z.B. Injektionslösungen, die dieses Gewebe und die Zelltransplantate beinhalten.

30

35

Die Degeneration der Bandscheiben wird während der Alterung oder durch Trauma ausgelöst und induziert akute und chronische Schmerzen und Instabilitäten in der Wirbelsäule. Mehr als 300.000 Patienten in Europa leiden an Bandscheibenerkrankungen. Ungefähr 70 % der Patienten, die

5 einen Bandscheibenvorfall erleiden und mittels Discectomie
behandelt werden, leiden weiterhin an Rückenschmerzen.
Anhaltende starke Schmerzen machen bei 10 % dieser
Patienten eine weitere operative Behandlung notwendig
10 (Yorimitsu et al, 2001). Grund dafür ist die durch die
Operation bedingte Abnahme der Bandscheibenhöhe, die damit
verbundene Erhöhung der lokalen Belastung des
Bandscheibengewebes (Brinckmann und Grootenboer, 1991) und
vor allem die fehlende Heilung und Regeneration des
zerstörten und entfernten Bandscheibengewebes (Lundon und
Bolton, 2001, Meakin et al., 2001). Mit fortschreitender
Zeit resultiert diese Instabilität der betroffenen
Bandscheibe in degenerativen Veränderungen angrenzender
Bandscheiben, wodurch weitere operative Eingriffe und im
schlimmsten Fall eine Fusion der Wirbelkörper oder das
20 Einsetzen einer Prothese notwendig werden. Deshalb ist die
biologische Reparatur bzw. Regeneration der Bandscheibe die
Zukunft für die Behandlung degenerierter Bandscheiben.

Eine bekannte Methode zur biologischen Regeneration eines
Gewebes ist die Knorpelzelltransplantation unter Verwendung
von körpereigenen Zellen, die zur Behandlung von
Gelenksknorpeldefekten angewandt wird. Dabei wird das
Potential der Gelenksknorpelzellen genutzt, um *in vivo* nach
Transplantation der Zellen neues Gewebe aufzubauen. Dazu
30 wird dem Patienten eine Gelenksknorpelbiopsie entnommen,
daraus Knorpelzellen isoliert, mittels Zellkultivierung
vermehrt und anschließend dem Patienten im Bereich des
Gewebedefektes, z.B. durch Einspritzen, transplantiert.
Dort bilden sie neues Gewebe und füllen somit den Defekt
35 vollständig auf. Durch diese Verfahren wird erreicht, dass
nach Applikation eines Zelltransplantates im Körper Gewebe

5 aufgebaut wird. Prinzipiell ist diese Methodik für die
Behandlung der Bandscheibendegeneration nicht anwendbar, da
den Patienten aus ethischen Gründen kein Ausgangsmaterial
aus einer intakten benachbarten Bandscheibe entnommen
werden kann und krankes Gewebe a priori nicht verwendbar
10 ist.

15 Erste Ansätze zum biologischen Ersatz der Bandscheibe gehen
von der Verwendung von gesundem Bandscheibengewebe aus. So
beschreiben Handley (US 6,080,579) und Ferree (US 6,340,369
B1) die Verwendung von normalem Bandscheibengewebe für die
Isolation von Bandscheibenzellen und die Kombination dieser
Zellen mit einem bioresorbierbaren Träger. Auch viele
wissenschaftliche Arbeiten haben die Verwendung von
normalem Bandscheibengewebe als Grundlage: Okuma et al.,
20 2000, Gruber et al., 2000, Chelberg et al., 1995. Jedoch
kann eine gesunde Bandscheibe eines Patienten nicht als
Gewebequelle zur Behandlung einer anderen Bandscheibe
dienen, da die Gewebeentfernung zu einer Zerstörung, zur
Degeneration und somit zum Verlust der Funktion dieser
Bandscheibe führt.

Ein anderer Ansatz ist die Verwendung von degeneriertem
Nukleus Pulposus Gewebe, welches aus dem Inneren einer
degenerierten Bandscheibe entfernt und aufgearbeitet wird.
Bei diesem operativen Eingriff wird die ohnehin schon
30 degenerierte und zerstörte Bandscheibe noch weiter
zerstört. Die Aufarbeitung des Gewebes wird dabei zum einen
vorgeschlagen als Dehydrierung (US 6,648,918) oder die
Kombination von darin befindlichen Zellen mit einem
Trägermaterial (US 6,569,442; US2001/0020476 A1) und die
35 anschliessende Transplantation zurück in diese

5 degenerierten Bandscheiben. Allerdings enthält das
dehydrierte Gewebe keine lebenden Zellen und stellt somit
keine Methode der biologischen Regeneration dar. Die
vorgeschlagene Kombination der Nukleus Zellen oder anderer
10 Zellen mit einem Trägermaterial stellt ebenfalls keine
reine biologische Methode dar und bedingt die Verwendung
eines geeigneten Trägermaterials, welches zum Beispiel
biomechanisch geeignet sein muss, welches im selben Masse
wie neues Gewebe aufgebaut werden soll abgebaut wird,
welches die Bildung neuen Gewebes nicht behindern darf oder
15 zum Beispiel keine immunologische Reaktion aufgrund der auf
jeden Fall verwendeten synthetischen, allogenen oder
xenogenen Materialien auslösen darf.

Eine weitere Behandlungsmöglichkeit wäre die Verwendung von
Bandscheiben anderer Patienten, wobei es sich somit um eine
20 allogene Transplantation handelt (6,344,058; Keith DK et
al., 2003). Hierbei stellt jedoch die immunologische
Reaktion ein Problem dar und durch die alleinige
Einbringung einer Spenderbandscheibe wird wahrscheinlich
auch keine biologische Regeneration der betroffenen
Bandscheibe ausgelöst.

Aus den genannten Problemen bestehen deshalb für die
Behandlung von degenerierten Bandscheiben und zur
Bandscheiberegeneration die allgemeinen Ziele darin:
30 medizinisch und ethisch vertretbares Ausgangsgewebe bzw.
-zellprobe zu verwenden, keine anderen oder die betroffene,
erkrankte Bandscheibe des Patienten zu zerstören, nur
patienteneigene Materialien zu verwenden (autologe
Therapie), optimale Zellisoliationsbedingungen und -
35 kultivierungsbedingungen zur Vermehrung der Bandscheiben-

5 zekllen und anschliessender Bandscheibenmatrixbildung zu
finden, zur Vermeidung von Immunreaktionen auf Träger-
materialien zu verzichten. Diese Probleme sind lösbar durch
die Transplantation eines speziellen autologen Zelltrans-
plantates oder durch Transplantation eines außerhalb des
10 Körpers vorgefertigten 3-dimensionalen Bandscheibenknorpel-
gewebes.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb,
Verfahren zur Herstellung von Bandscheibenknorpelzell-
transplantaten und stabilem vitalen Bandscheibenknorpel-
gewebe bereitzustellen, die zur autologen Transplantation,
zum schnellen Wiederaufbau und der Erhaltung der Funktion
der Bandscheibe geeignet sind. Dabei ist es essentiell,
dass das Ausgangsmaterial zur Herstellung der Zelltrans-
20 plantate medizinisch und ethisch vertretbar entnommen
werden kann sowie, dass die autolog kultivierten
Bandscheibenzellen ihre Eigenschaften über den Zeitraum von
der Entnahme bis zur Transplantation nicht verändern und
eine hohe Proliferations- und Differenzierungskapazität
aufweisen.

Überraschend konnte gezeigt werden, dass als
Ausgangsmaterial erkranktes Bandscheibengewebe verwendet
werden kann. Bisher wurde angenommen, dass es nicht möglich
30 ist, aus degeneriertem Gewebe, adulte Zellen in
ausreichender Anzahl zu isolieren, die vital sind,
ausreichend proliferieren und anschließend auch noch in der
Lage sind, gewebespezifisch zu differenzieren und
Bandscheibengewebe aufzubauen, da in Geweben, die einer
35 Degeneration unterliegen die gewebespezifische Zellen ihre

5 Eigenschaften im Hinblick auf die Matrixsynthese verändern
und auch absterben und auch durch andere Zellen mit anderen
gewebe-unspezifischen Eigenschaften ersetzt werden.
Überraschenderweise konnte jedoch aus vorgefallenem
degenerierten Bandscheibengewebe eine ausreichende Anzahl
10 an vitalen Zellen isoliert werden. Das vorgefallene
degenerierte Bandscheibengewebe besteht aus
Bandscheibenteilen des Anulus Fibrosus und Nucleus
Pulposus, wobei die aus beiden Gewebebereichen isolierten
Zellen (Anulus Fibrosus Zellen und Nucleus Pulposus Zellen)
15 unter den gegebenen autologen Kulturbedingungen dann auch
noch proliferieren und gewebespezifisch besonders
spezifisch differenzieren. Damit sind diese
Gemischzelltransplantate für eine zell-basierte Therapie
zur Wiederherstellung der Funktion der Bandscheibe
20 geeignet.

Es ist somit erstmals ein Verfahren beschrieben, durch
welches besondere autologe Gemisch-Bandscheibenzell-
transplantate hergestellt werden können, die nach
Transplantation in eine geschädigte/ erkrankte Bandscheibe
durch den Aufbau neuen Bandscheibengewebes die Erhaltung
der Bandscheibe und damit die Wiederherstellung der
neurologischen und mechanischen Funktion der Wirbelsäule
bei einer Bandscheibenerkrankung oder nach einem
30 Bandscheibenvorfall erlaubt.

Auch bei fortgeschrittener Degeneration der Bandscheibe,
d.h. auch bei Degeneration oder traumatischer Schädigung
der äußeren Schicht der Bandscheibe (Anulus Fibrosus), ist
35 durch die vorliegende Erfindung die Wiederherstellung und

5 Erhaltung der neurologischen, biologischen und mechanischen
Funktion der Bandscheibe ermöglicht, wenn aus
vorgefallenen, degenerierten Bandscheiben Gemisch-
Gewebezellen isoliert werden, die folgend zu einem
autologen 3-dimensionalen Gewebe ohne die Verwendung von
10 Trägermaterialien kultiviert werden.

Bei der Behandlung mit den erfindungsgemäßen
Bandscheibenzelltransplantaten ist es vorteilhaft, wenn vor
der Transplantation die äußere Hülle der Bandscheibe, der
Anulus Fibrosus, der durch den Austritt des
Bandscheibengewebes geschädigt wurde, in der Art heilt,
dass keine Flüssigkeit, wie die hergestellten
Zelltransplantate, aus dem Inneren der Bandscheibe mehr
auslaufen kann. Dieser Zeitraum ist patientenabhängig.
20 Während dieses Zeitraumes werden die Bandscheibenzell-
transplantate hergestellt, wobei die Gemisch-
Bandscheibenzellen während der Vermehrung in der Zellkultur
ihre gewebe-spezifischen Eigenschaften im Hinblick auf
deren Differenzierungspotential und damit den Erfolg der
Transplantation erhalten. Im Gegensatz dazu wird dieses
Potential bei der getrennten Kultivierung der Anulus
Fibrosus und Nucleus Pulposus Zellen verringert, wobei nach
Überführung in die 3-dimensionale Umgebung einige
Bandscheiben-spezifische Marker nicht exprimiert werden.
30 Deshalb sind nur die Gemisch-Kulturen besonders geeignet
Bandscheibengewebe nach deren Transplantation in eine
degenerierte Bandscheibe aufzubauen.

Außerdem sollen die in vitro hergestellten Zell- und
35 Gewebetransplantate keine immunologischen Reaktionen im

5 Organismus, der das Transplantat erhält, auslösen. Es wurde
überraschender Weise gefunden, dass diese erfindungsgemäß
autolog hergestellten Zellen und Gewebe keine
immunologische Reaktionen auslösen.

10 Das entnommene, patienteneigene erkrankte Bandscheiben-
gewebe kann unterschiedlich weiter bearbeitet werden:

15 (a) Aus den Biopsien werden die Gemisch-Bandscheibenzellen
mittels enzymatischem Verdau des Gewebes, durch
Auswandern oder durch Reagenzien, die Zielzellen
erkennen, mit üblichen Methoden isoliert. Diese Zellen
werden dann nur unter Zusatz von körpereigenem
Serum und ohne Zusatz von exogenen wachstumsfördernden
Verbindungen und ohne den Zusatz von Antibiotika und
20 mit üblichem Kulturmedium in Zellkulturgefäßen
kultiviert und so lange vermehrt, bis eine ausreichende
Menge an Zellen zur Verfügung steht. Diese Zeit wird so
kurz wie möglich gehalten, um ihre phänotypischen
Eigenschaften nicht zu verändern. Nach ausreichender
Vermehrung der Zellen werden diese geerntet und das
Zelltransplantat bestehend aus einer Bandscheibenzell-
suspension ist für therapeutische Verwendungen
bereitgestellt.

30 Erfindungsgemäß werden die isolierten Bandscheibenzellen im
Gemisch verwendet, d.h. die Zellen werden nicht nach Anulus
Fibrosus und Nucleus Pulposus Zellen, deren Gewebeanteile
im vorgefallenen Bandscheibengewebe enthalten sind,
aufgetrennt und getrennt oder nur als Einzelzellart
35 kultiviert. Genau unter diesen Gemisch-Bedingungen wird

5 eine spätere verbesserte Bandscheiben-spezifische
Differenzierung der Zellen erreicht (siehe Bearbeitung b)).
Diese autologe Gemisch-Kultiverungstechnik zur Vermehrung
der Bandscheibenzellen ermöglicht somit erstmals eine
10 Bandscheiben-spezifische Differenzierung dieser so
kultivierten Zellen, nachdem diese in eine 3-dimensionale
Umgebung überführt werden.

(b) In einem weiteren Verfahren werden die isolierten
Bandscheibenzellen vorkultiviert und ohne Passagierung
der Zellen nur kurzzeitig vermehrt. Danach werden die
vorkultivierten Zellen geerntet und eingefroren und bis
zum Zeitpunkt der Transplantation tiefgefroren
gelagert. Vor der Transplantation werden die Zellen
aufgetaut und bis zum Erreichen einer ausreichenden
20 Zellzahl mit autologem Serum und in herkömmlichem
Zellkulturmedium weiterkultiviert. Nach ausreichender
Vermehrung der Zellen werden diese geerntet und das
Zelltransplantat bestehend aus einer Band-
scheibenzellsuspension bereitgestellt. Überraschen-
derweise wurde festgestellt, dass die
Bandscheibenzellen durch das Einfrieren und Auftauen
nicht ihre spezifischen Eigenschaften im Hinblick auf
die Synthese von spezifischen Marker- und
30 Matrixproteinen verlieren.

(c) In einem weiteren bevorzugten Verfahren wird als
Ausgangsmaterial ebenfalls patienteneigenes erkranktes
Bandscheibengewebe verwendet. Aus den Biopsien werden
die gewebeaufbauenden Zellen aus dem Anulus Fibrosus
35 und Nucleus Pulposus mittels enzymatischem Verdau des

5 Gewebes, durch Auswandern oder durch Reagenzien, die
Zielzellen erkennen, mit üblichen Methoden isoliert.
Diese Gemisch-Zellen werden dann unter autologen
Bedingungen und mit üblichem Kulturmedium zunächst in
10 Monolayer kultiviert bis eine ausreichende Zellzahl
erreicht ist und anschließend in Zellkulturgefäße mit
hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden
überführt und dort so lange in Suspension kultiviert,
bis ein dreidimensionales Zellaggregat entsteht, das zu
15 mindestens 40 Volumen%, vorzugsweise mindestens
60 Volumen% bis maximal 99 Volumen%, extrazelluläre, de
novo synthetisierte Matrix (ECM) beinhaltet, in welche
differenzierte Zellen eingebettet sind. Der Fachmann
kann diese Werte durch Entnahme kleinerer Proben
bestimmen. Das entstandene Zellaggregat weist einen
20 äußeren Bereich auf, in welchem proliferations- und
migrationsfähige Zellen vorhanden sind (siehe auch
Abb. 1).

Erfindungsgemäß werden die isolierten Bandscheibenzellen im
Gemisch verwendet, d.h. die Zellen werden nicht nach Anulus
Fibrosus und Nucleus Pulposus Zellen aufgetrennt und
getrennt oder nur als Einzelzellart kultiviert. Genau unter
diesen Gemisch-Bedingungen wird in der 3-dimensionalen
Kultur und damit bei der Bildung der 3-dimensionalen
30 Bandscheibengewebe die Bandscheiben-spezifische Differen-
zierung der Gemischzellen gefördert, wobei die Expression
von Bandscheiben-spezifischen Markern nur in diesen
Kulturen erreicht werden kann und die Bildung der 3-
dimensionalen Bandscheibengewebe bei Verwendung der
35 Gemischkulturen gefördert ist. Diese autologe Gemisch-

5 Kultivierungstechnik ermöglicht somit erstmals die
Herstellung und Verwendung eines Bandscheiben-spezifischen
Gewebetransplantates, welches autolog aus degenerierendem,
vorgefallenen Bandscheibengewebe hergestellt wurde.

10 Die Gemisch-Bandscheibenzellen, die aus erkranktem
Bandscheibengewebe isoliert werden und aus denen autologe
3-dimensionale Bandscheibenzellaggregate hergestellt
werden, so dass die entnommenen Zellen in einem de novo
synthetisierten Gewebe integriert sind, überleben auch mit
15 fortschreitender Kultivierungsdauer, d. h. die Zellen im
Inneren der Aggregate sterben nicht ab. Mit
fortschreitender Kultivierungsdauer differenzieren die
Zellen im Inneren der Aggregate aus und es bilden sich
Bandscheibenknorpelgewebe, die aus ECM, differenzierten
20 Zellen und einer Proliferationszone am Rand bestehen.
Während der Differenzierung in der autologen Zellkultur
wird der Abstand der aggregierten Zellen durch Bildung der
gewebespezifischen Matrix immer größer. Es entsteht im
Inneren der in vitro hergestellten Bandscheibengewebe eine
Gewebehistologie, die dem natürlichen Gewebe sehr ähnlich
ist. Während der weiteren Herstellung der
Bandscheibenknorpelgewebe bildet sich die
"Proliferationszone" am Rand selbiger aus. Diese Zone hat
den unschätzbaren Vorteil, dass nach Einbringen der so
30 entstandenen Bandscheibenknorpelgewebe in degenerierte
Bandscheiben, die in dieser Randzone befindlichen Zellen in
der Lage sind, auszuwandern und aktiv den Kontakt zum
umliegenden Gewebe herzustellen bzw. eine Integration des
in vitro gebildeten Bandscheibenknorpelgewebes in seine
35 Umgebung ermöglichen. Damit sind die hergestellten

5 gewebespezifischen Zellaggregate hervorragend zur Behandlung von degenerierten Bandscheiben und zum Neuaufbau von Bandscheibengewebe *in vivo* geeignet.

10 Aufgrund der biomechanischen Belastung der Bandscheiben direkt nach Behandlung sowie dem Ziel die Bandscheibe in ihrer Höhe gleich mit der Transplantation des Bandscheibenknorpelgewebes wiederherzustellen, kann es von Vorteil sein, bereits größere und mechanisch stabile Gewebestücke zu transplantieren. Für diesen Fall werden
15 mindestens zwei, besser aber mehr der erhaltenen *in vitro* Bandscheibenknorpelgewebe fusioniert, indem sie gemeinsam unter den gleichen Bedingungen und in den gleichen Kulturgefäßen wie oben beschrieben bis zur gewünschten Größe weiterkultiviert werden (siehe auch Abb. 4).

20

Als Zellkulturmedium kann sowohl für die Suspensions- als auch für die Monolayerkultur übliches Medium, z. B. Dulbecco's MEM, unter Zusatz von Serum, verwendet werden. Vorzugsweise wird DMEM und Hams im Verhältnis 1:1 eingesetzt. Um jedoch immunologische Reaktionen des Patienten auf das *in vitro* hergestellte Gewebe zu vermeiden, wird als Serum vorzugsweise autologes Serum des Patienten eingesetzt. Es ist auch möglich xenogenes oder
allogenes Serum zu verwenden.

30

Dem Kulturmedium werden erfindungsgemäß keine Antibiotika, Fungistatika oder andere Hilfsstoffe zugesetzt. Es hat sich gezeigt, dass nur die autologe oder allogene Kultivierung der Zellen und Zellaggregate sowie die Kultivierung ohne
35 Antibiotika und Fungistatika eine unbeeinflusste

5 Proliferation sowie Differenzierung der Zellen in der
Monolayerkultur und eine ungestörte Bildung der spezi-
fischen Matrix in den Zellaggregaten ermöglicht. Weiterhin
sind durch den Verzicht von Zusatzstoffen während der
Herstellung nach Einbringen des in vitro hergestellten
10 Gewebes in den menschlichen und auch tierischen Organismus
immunologische Reaktionen ausgeschlossen.

Die Größe der hergestellten Bandscheibengewebe hängt von
der eingebrachten Zellzahl pro Volumen Kulturmedium ab.
15 Werden beispielsweise 1×10^7 Zellen in 300 μ l Kulturmedium
eingebracht, so entstehen innerhalb von 1 Woche dreidi-
mensionale Bandscheibenzellaggregate von ca. 500-700 μ m
Durchmesser. Die andere Möglichkeit ist die in vitro-Fusion
der kleinen Zellaggregate zu größeren - wie oben
20 beschrieben - und das Einbringen dieser in die Bandscheibe.
Vorzugsweise werden erfindungsgemäß zwischen 1×10^4 und
 1×10^7 Zellen in 300 μ l Kulturmedium zur Herstellung der
kleinen Zellaggregate verwendet, besonders bevorzugt
 1×10^5 Zellen. Die nach einigen Tagen gebildeten in vitro
Bandscheibengewebe werden dann für mindestens 2-4 Wochen in
Abhängigkeit von der Zellart und den patientenspezifischen
Charakteristika in dem geeigneten Kulturmedium kultiviert,
um die Ausbildung der gewebespezifischen Matrix zu
induzieren. Im besonderen Falle können dann einzelne in
30 vitro Bandscheibengewebe ab ca. einer Woche Kultivierung
fusioniert werden, um die Größe des Gewebestückes zu
erhöhen.

Als Zellkulturgefäße kommen für die erfindungsgemäße
35 Kultivierung in Suspension bevorzugt solche mit

5 hydrophober, also adhäsionsverhindernder Oberfläche, in
Betracht, wie z. B. Polystyrol oder Teflon.
Zellkulturgefäße mit nichthydrophober Oberfläche können
durch Beschichten mit Agar oder Agarose hydrophobiert
werden. Weitere Zusätze sind nicht erforderlich.
10 Vorzugsweise dienen als Zellkulturgefäße Napfplatten. Dabei
können für die Herstellung der kleinen Zellaggregate
beispielsweise 96-Napfplatten und für die Herstellung der
fusionierten Aggregate 24-Napfplatten Verwendung finden.

15 Gegenstand der Erfindung sind auch therapeutische
Zubereitungen, die die erfindungsgemäßen Bands-
scheibenzelltransplantate und das Bandscheibenknorpelgewebe
umfassen, z.B. Injektionslösungen.

20 Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung des
erfindungsgemäßen Bandscheibenknorpelgewebe zur Testung von
Wirkstoffen, die z. B. die Bildung und Differenzierung von
Matrix und Zellen beeinflussen. Dazu werden die
Bandscheibenzellaggregate erfindungsgemäß hergestellt und
in unterschiedlichen Reifestadien werden die zu testenden
Medikamente hinzugegeben und unterschiedlichste Parameter
der in vitro Bandscheibengewebeherstellung und -reifung
charakterisiert. Diese Tests sind im Vergleich zu den
herkömmlichen Medikamententests an Tieren oder
30 Tumorzellsystemen durch die Verwendung von nur autologem
Material patientenspezifisch und ermöglichen eine
individuelle Diagnose.

35 Nachfolgend soll die Erfindung an Ausführungsbeispielen
näher erklärt werden, ohne sie darauf einzuschränken.

5

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1: Herstellung von Bandscheibenzelltransplantaten

10

Aus dem erkrankten Bandscheibengewebe werden mittels enzymatischen Verdaus durch Inkubation mit Kollagenaselösung die Bandscheibenknorpelzellen aus dem Anulus Fibrosus und Nucleus Pulposus isoliert. Nach Trennung der isolierten Zellen vom unverdauten Gewebe, werden diese als Gemischzellpopulationen in Zellkulturflaschen überführt und unter Zugabe von DMEM / Hams F12 Kulturmedium (1/1) und 10% autologem Serum des Patienten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zweimal wöchentlich wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach Erreichen des konfluenten Stadiums wird die Zellschicht mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und mittels Trypsin von der Zellkulturoberfläche geerntet. Nach einer weiteren Waschung werden die Bandscheibenzellen in physiologische Kochsalzlösung überführt und zur Transplantation zur Verfügung gestellt.

15

20

30

In einem in vitro Modell konnte das Differenzierungspotential der im Zelltransplantat enthaltenen Bandscheibenzellen aufgezeigt werden. Es werden bandscheibenspezifische Matrixproteine und Markerproteine exprimiert (Abb. 3) und damit eine bandscheibenspezifische Gewebestruktur aufgebaut.

5 Beispiel 2: Transplantation von Bandscheibenknorpelzellen

Die in Beispiel 1 hergestellten Bandscheibenzell-
transplantate (mind. 1.000 Zellen, max. 100 Millionen
Zellen) vorzugsweise ca. 1 Million

10 Bandscheibenknorpelzellen wurden in physiologischer
Kochsalzlösung aufgenommen und in die erkrankte Bandscheibe
eingespritzt. Es wurde unter anderem festgestellt, dass in
15 der behandelten Bandscheibe der Wassergehalt wieder
ansteigt, sowie die Höhe des Zwischenwirbelraumes
aufrechterhalten werden kann, was beides auf die durch die
Bandscheibenknorpelzellen synthetisierten Matrixproteine
zurückzuführen ist.

Die erfindungsgemäße in vitro hergestellte
20 Bandscheibenzelltransplantate werden von den Patienten
angenommen, gewährleisten eine schnelle Integration der
proliferationsfähigen und migrationsfähigen Zellen sowie
eine Regeneration des Bandscheibengewebes durch die
Differenzierungsfähigkeit der enthaltenen Zellen. Somit
erlauben die Bandscheibenzelltransplantate den schnellen
Wiederaufbau von Bandscheibengewebe, eine schnelle Genesung
der Patienten und die Wiederherstellung der Band-
scheibenfunktion.

30 Beispiel 3: in vitro Herstellung von Bandscheibenknorpel-
gewebe

Aus dem vorgefallenen Bandscheibengewebe werden mittels
enzymatischen Verdaus durch Inkubation mit
35 Kollagenaselösung die Bandscheibenknorpelzellen aus dem

5 Anulus Fibrosus und Nucleus Pulposus isoliert. Nach
Trennung der isolierten Zellen vom unverdauten Gewebe,
werden diese als Gemischkultur in Zellkulturflaschen
überführt und unter Zugabe von DMEM / Hams F12 Kulturmedium
(1/1) und 10% autologem Serum des Patienten bei 37°C und 5%
10 CO₂ inkubiert. Zweimal wöchentlich wird ein Mediumwechsel
durchgeführt. Nach Erreichen des konfluenten Stadiums wird
die Zellschicht mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen
und mittels Trypsin von der Zellkulturoberfläche geerntet.
Nach einer weiteren Waschung werden 1×10^5 Zellen in je
ein Zellkulturgefäß überführt, das mit Agarose beschichtet
ist. Nach einem Tag haben sich die ersten Zellen in
Aggregaten angeordnet. Diese Aggregate werden regelmäßig mit
frischem Medium versorgt und für mindestens 2 Wochen
kultiviert.

20 Den Aufbau der erhaltenen Bandscheibenknorpelgewebe
verdeutlicht die mikroskopische Aufnahme in Abb. 1, die den
Querschnitt eines erfindungsgemäß hergestellten
Bandscheibengewebes mit M als Zone verminderter
Proliferation und Bildung von gewebespezifischen
Matrixproteinen und P als äußere Proliferationszone zeigt.

In diesen in vitro Bandscheibengeweben wurde die Expression
und Deposition von bandscheibenspezifischen Matrix-
bestandteile und regulatorische Proteine wie Aggrecan
30 (Abb. 3a), hyalin-spezifische Proteoglykane (Abb. 3b),
Kollagen Typ I (Abb. 3c), Kollagen Typ II (Abb. 3d),
Kollagen Typ III (Abb. 3e) und S100 (Abb. 3f) nachgewiesen.
Diese sind Bestandteile des nativen
35 Bandscheibenknorpelgewebes in vivo und stellen die

5 wichtigsten Strukturproteine dar, die für die Funktion des Bandscheibenknorpels von entscheidender Bedeutung sind.

Es war überraschend, dass die aus dem erkrankten Bandscheibengewebe isolierten Bandscheibenzellen, wenn
10 diese als Gemisch aus Anulus Fibrosus und Nucleus Pulposus kultiviert werden, eine hohe Proliferationskapazität (Abb. 2) sowie ein sehr hohes Differenzierungspotential zur Bildung bandscheibenspezifischer Matrixproteine und regulatorischer Proteine aufweisen und ihre Eigenschaften durch das Prozedere des Einfrierens und Auftauens erhalten werden können.

Beispiel 4: Transplantation von Bandscheibenknorpelgewebe

20 Das in Beispiel 3 hergestellte Bandscheibenknorpelgewebe (ca. 10 bis 1000 Gewebestückchen aus je $1 \cdot 10^5$ Zellen) vorzugsweise 100 Gewebestückchen wurden in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und in den Zwischenwirbelraum von erkrankten oder geschädigten Bandscheiben eingespritzt. Das erfindungsgemäß in vitro hergestellte Bandscheibenknorpelgewebe wird von den Patienten angenommen und gewährleistet neben der Erfüllung der mechanischen Funktion des hergestellten Gewebes die schnelle Integration der hergestellten Gewebestücke durch die
30 proliferationsfähigen und migrationsfähigen Zellen in der äußeren Schicht der Aggregate sowie eine Regeneration des Bandscheibengewebes durch die Differenzierungsfähigkeit der enthaltenen Zellen. Somit erlaubt die Struktur und Funktion der Gewebestücke den schnellen Wiederaufbau von

5 Bandscheibengewebe, eine schnelle Genesung der Patienten
und die Wiederherstellung der Bandscheibenfunktion.

Abb. 4 zeigt fünf fusionierende Bandscheibengewebe. Es ist
zu sehen, dass die beiden Gewebekugeln aneinander haften
10 und sozusagen verschmelzen, die Grenze zwischen den beiden
Bandscheibengeweben ist nicht mehr zu erkennen. Nach
längerer Kultivierungszeit fusionieren die
Bandscheibengewebe vollständig und es entsteht ein größeres
in vitro Gewebestück. Der Aufbau der so erhaltenen größeren
15 Zellaggregate ist mit dem der zunächst erhaltenen in vitro
Bandscheibengewebe identisch. Sie können bis zu maximal 99%
ECM beinhalten und die im erhaltenen Gewebestück
enthaltenen Zellen sind vital.

5 **Patentansprüche**

1. Verwendung von degeneriertem Bandscheibengewebe zur Herstellung eines therapeutischen Mittels zur Behandlung von Bandscheibendefekten.
- 10 2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das degenerierte Bandscheibengewebe vorgefallenes degeneriertes Gewebe ist.
- 15 3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das isolierte Bandscheibengewebe, insbesondere Bandscheibenzellen, unter autologen Kultivierungsbedingungen nur unter Zusatz von patienteneigenem Serum im Zellkulturmedium vermehrt werden.
- 20 4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die isolierten Bandscheibenzellen während der Vermehrung in einem Zellkulturmedium, das 1-20% autologen Serumzusatz enthält und dessen Verhältnis von alpha-MEM-Medium und HAM-F12-Medium zwischen 1:1 beträgt, und bei 36.8-37°C, 5% Kohlendioxid Luftanteil und einer Luftfeuchte von 85-95% kultiviert sind und dadurch ihre Synthese von Matrixproteinen und Markerproteinen nicht verändern.
- 30 5. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass
- 35

5 die isolierten Bandscheibenzellen nach ihrer Vermehrung
in Monolayer in einem Zellkulturmedium, das 1-20%
autologen Serumzusatz enthält und dessen Verhältnis von
10 alpha-MEM-Medium und HAM-F12-Medium zwischen 1:1
beträgt, und bei 36.8-37°C, 5% Kohlendioxid Luftanteil
und einer Luftfeuchte von 85-95% kultiviert und dadurch
differenzierungsfähig sind und Matrixstrukturen bilden,
die spezifische Bandscheibenmatrixproteine umfassen.

15 6. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
die kultivierten Zellen aus eingefrorenem Material
gewonnen werden.

20 7. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
die isolierten Bandscheibenzellen nach deren Vermehrung
in Monolayer in einer Lösung aus 10 % DMSO, 20 % Serum
und 70 % Kulturmedium eingefroren und wieder aufgetaut
werden können und so deren Eigenschaften im Hinblick
auf die Synthese von spezifischen Matrixkomponenten und
Markern nicht zu verändern.

30 8. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
die isolierten Bandscheibenzellen nach deren Vermehrung
in Monolayer die isolierten Bandscheibenzellen nach
deren Vermehrung in Monolayer in einer Lösung aus 10 %
DMSO, 20 % Serum und 70 % Kulturmedium eingefroren und
wieder aufgetaut werden und so deren Eigenschaften im
35 Hinblick auf die Synthese von spezifischen

- 5 Matrixkomponenten und Markern nicht verändern und dass
die Bandscheibenzellen nach dem Einfrieren und
folgendem Auftauen Gewebestrukturen aufbauen, die aus
Bandscheiben-spezifischen Matrixproteinen bestehen.
- 10 9. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
dass die isolierten, spezifisch vermehrten und ggf.
spezifisch eingefrorenen und aufgetauten
Bandscheibenzellen nach deren Transplantation im Körper
eines Patienten Bandscheibengewebe in vitro aufbauen.
10. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
die aus dem Bandscheibengewebe isolierten Zellen in
20 einem Kulturgefäß mit hydrophober Oberfläche und sich
verjüngendem Boden kultiviert und so dreidimensionale
Zellaggregate erhalten werden.
11. Verfahren zur Herstellung von Bandscheibenzelltran-
splantaten,
dadurch gekennzeichnet, dass
aus vorgefallenem degeneriertem Bandscheibengewebe
und/oder erkranktem Bandscheibengewebe,
Bandscheibenzellen isoliert und unter Zusatz von
30 körpereigenem Serum als dreidimensionalen Aggregate
kultiviert und so Bandscheibenzelltransplantate
erhalten werden.
12. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch,
35 dadurch gekennzeichnet, dass

- 5 das Bandscheibengewebe nach kurzer Vorkultivierung eingefroren wird.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass
- 10 die Bandscheibenknorpelzelltransplantate und in-vitro-Bandscheibenknorpelgewebe in Gegenwart von wachstumsfördernden Zusätzen kultiviert werden.
14. Bandscheibengeweberegenerationsmittel erhältlich dadurch, dass
- 15 aus degeneriertem Bandscheibengewebe Zellen isoliert, kultiviert, geerntet und als Bandscheibenregenerationsmittel verwendet werden.
- 20 15. Mittel nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen nach kurzer Vorkultivierung eingefroren werden.
16. Mittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass
- die Kultivierung im wesentlichen nur unter Zusatz von körpereigenem Serum erfolgt.
- 30 17. Mittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel ein durch Kultivierung der Zellen in Kulturgefäßen mit hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden gewonnenes dreidimensionales Gewebe
- 35 ist.

5

18. Mittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mehrere Gewebe miteinander fusioniert sind.

10

19. Mittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel ein Gemisch aus kultivierten Zellen und dem dreidimensionalen Gewebe ist.

15

20. Mittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass aus degeneriertem Bandscheibengewebe Zellen isoliert, kultiviert, geerntet und das Bandscheibenregenerationsmittel erhalten wird.

20

21. Verwendung der Mittel nach einem der Ansprüche 15 - 20 zur Testung von Wirkstoffen.

22. Verwendung der Mittel nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel mit den Wirkstoffen in Kontakt gebracht und die Bildung und Differenzierung des Mittels im Vergleich zu einem Mittel, welches nicht mit den Wirkstoffen in Kontakt gebracht wird, bestimmt wird.

30

23. Zelltherapeutische Zubereitungen umfassend Bandscheibenregenerationsmittel gemäß einem der Ansprüche 15 bis 20.

35

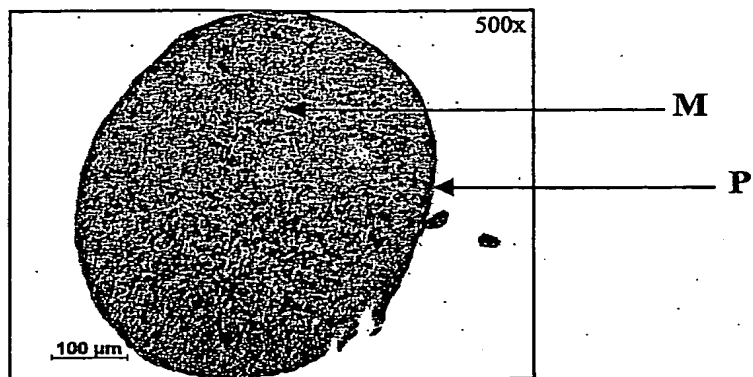


Abb.1

Gemisch-Gewebe P2

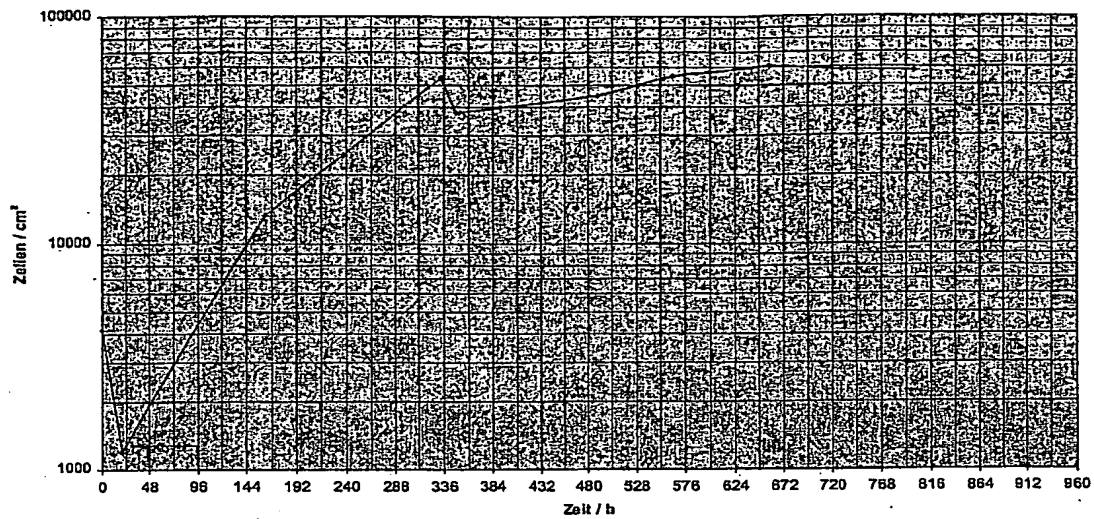


Abb.2

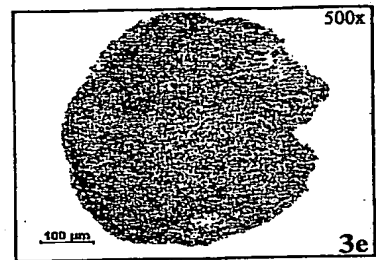
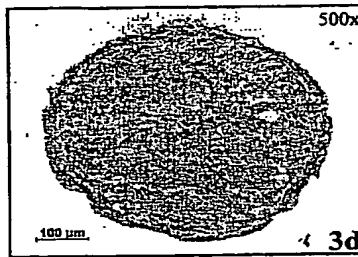
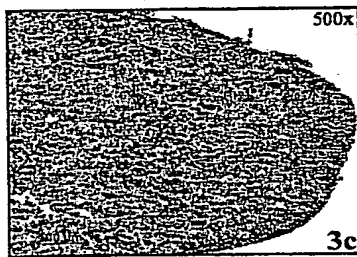
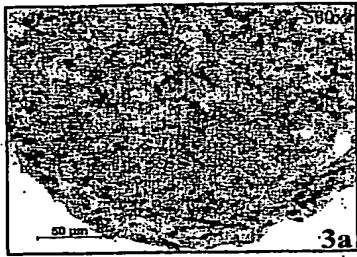


Abb.3

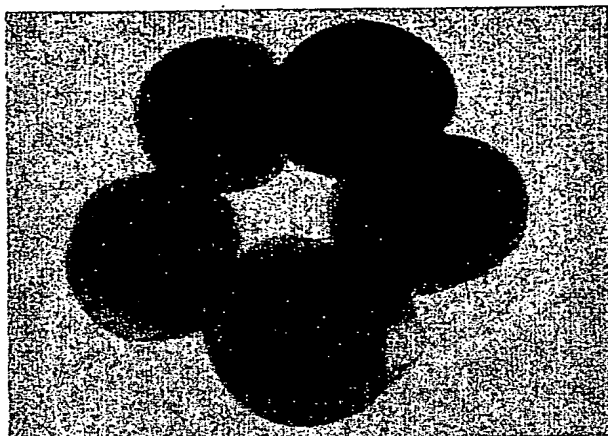


Abb.4

5

Zusammenfassung

10

15

20

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur in vitro Herstellung von Bandscheibenknorpelzelltransplantaten aus erkranktem Bandscheibengewebe von Patienten und dessen Anwendung als Transplantationsmaterial zur Behandlung von erkrankten Bandscheiben. Die Erfindung betrifft weiterhin dreidimensionales, vitales und mechanisch stabiles Bandscheibenknorpelgewebe und dessen Verwendung als Transplantationsmaterial zur Behandlung von erkrankten Bandscheiben sowie zur Testung von Wirkstoffen. Gegenstand der Erfindung sind weiterhin die hergestellten Bandscheibenzelltransplantate und die hergestellten Bandscheibenknorpelgewebe und therapeutische Zubereitungen, z.B. Injektionslösungen, die dieses Gewebe und die Zelltransplantate beinhalten.